

BY

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-3019

(43) 公開日 平成9年(1997)1月7日

(51) Int.Cl'	類別記号	序内整理番号	P I	技術表示箇所
C 07 C 233/81		9547-4H	C 07 C 233/81	
A 61 K 31/165	ABX		A 61 K 31/165	ABX
31/275	ABN		31/275	ABN
31/425	ADS		31/425	ADS
31/44	ACV		31/44	ACV

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全7頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-151896

(22) 出願日 平成7年(1995)6月19日

(71) 出願人 00010953

テルモ株式会社

東京都渋谷区鶯ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 碓崎 正史

神奈川県足柄上郡中共町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72) 発明者 中澤 圭一

神奈川県足柄上郡中共町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72) 発明者 稲川 博明

神奈川県足柄上郡中共町井ノ口1500番地

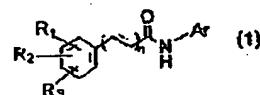
テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 アミド誘導体およびそれを含有する医薬剤

(57) 【要約】

【構成】 2-(2,5-ジメトキシシンナモイルアミノ)チアゾールなどの下記一般式(1)で示されるアミド誘導体およびそれを含有する医薬剤。

【化1】



式1中、R1、R2、R3は、同一または異なって、水素、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基を示し、Ar4は、アリール基、nは0または1の整数を示す。

【効果】 平滑筋細胞に対する増殖抑制作用を有し、血管壁肥厚防止薬として有効である。

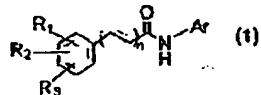
(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記一般式(1)で示されるアミド誘導体。

【化1】



(式1中、R₁、R₂、R₃は、同一または異なって、水素、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基を示し、Arは、アリール基、nは0または1の整数を示す。)

【請求項2】請求項1記載のアミド誘導体を含有してなる医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、平滑筋細胞、骨メサンジウム細胞、線維芽細胞等の数種の中胚葉系細胞の増殖抑制作用を有し、PTCA後の再狭窄、慢性腎球体腎炎等に代表される炎症性並びに細胞増殖性線維硬化症を効果的に治療しうるアミド誘導体、およびそれを含有する医薬製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】狭心症、心筋梗塞等における病態の発症は、それに先行して生じる冠動脈硬化症が大きな原因であることが知られている。動脈硬化によって生じる内腔の狹小化や血管の弹性消失が、心筋組織への栄養および酸素不足をもたらし、上記病態を誘導する。血管内腔の狭小化は、泡沫化マクロファージやコレステロールの内壁への蓄積に加え、血管中膜平滑筋細胞の内膜への遊走、内膜での増殖によって生じる細胞遊走性内膜肥厚がその大きな原因であると言われている。近年、狭窄像を呈する動脈硬化血管を外科的に治療する方法として、經皮的冠動脈拡張術(Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty:PTCA)が普及しつつある。PTCA術は大動脈などからバルーンカテーテルを遠隔的に挿入してゆき、狭窄部でバルーンを膨らませ、物理的に血管を拡張させるものである。

【0003】しかし、この治療法の最大の問題点は、施行後3~6ヶ月で、施行例の30~50%に再び狭窄が起きることである(Spencer B.King; Am.J.Cardiol., 1987, 59(3), 1B)。この再狭窄は、コレステロールの沈着は観察されず、むしろそのほとんどを平滑筋細胞やこの細胞が產生する細胞間マトリックスによって構成された、いわゆる細胞遊走性内膜肥厚である。従って、PTCA術後の再狭窄防止、ひいては動脈硬化の治療法としては、血管内腔で生じる平滑筋細胞の遊走、増殖を抑制することが有効である。現在のところ、そのような従来技術としては特許公報特開平6-135829号、特許公報特開平6-305966号が報告されているが、平滑

19

29

39

49

59

2

筋細胞の増殖をより強く抑制する活性物質の出現が強く望まれている。

【0004】同様に慢性腎炎においても糸球体内でメサンジウム細胞の増殖並びに細胞間マトリックス増生が腎硬化をもたらし、腎機能低下を引き起こす原因であることが知られている。そのほか、肝硬変症では間葉系細胞の星細胞の増殖並びにコラーゲンの異常産生が、肺繩維症、腹膜透析時に生じる腹膜肥厚においても炎症後に生じる線維芽細胞の異常増殖並びに細胞間マトリックス増生が病態の原因であると言われている。そのためこれら細胞の異常増殖並びに細胞間マトリックス増生を有効に治療しうる薬剤の開発が切望されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、PTCA術後の再狭窄防止薬、自家血管および人工血管移植後の再狭窄防止薬等においては動脈硬化の治療薬および予防薬として有用である化合物およびこれを有効成分とする血管壁肥厚防止薬を提供すること目的とする。加えて同様に炎症によって誘導される細胞増殖並びに細胞間マトリックスの増生に起因する線維症あるいは線維性硬化症治療に有効な化合物としても提供する。

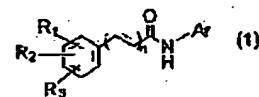
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、新規のアミド誘導体に着目し、それらの薬理活性を鋭意検討した結果、驚くべくことに本発明のアミド化合物が、PDGFによって惹起される培養平滑筋細胞の増殖作用を特異的に抑制することを見い出し、本発明を完成させた。前記本発明とは以下の通りである。

【0007】下記一般式(1)で示されるアミド誘導体である。

【0008】

【化2】



【0009】(式1中、R₁、R₂、R₃は、同一または異なって、水素、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基を示し、Arは、アリール基、nは0または1の整数を示す。)

【0010】また、本発明は上記のアミド誘導体を含有してなる医薬製剤である。また、本発明は上記のアミド誘導体を含有してなる血管壁肥厚防止薬である。

【0011】本明細書において「アルキル」とは、直鎖状または分岐鎖基を意味し、これにはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ベンチル基、イソベンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基などが含まれるが、これらに限定されるものではない。

3

【0012】本明細書において「アルコキシ」とは、 $-OR_1$ (R_1 はアルキル基)を意味し、これには、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブロキシ基、sec-ブロキシ基、イソブロキシ基、tert-ブロキシ基などが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0013】本明細書において「アリール」とは、置換または非置換の炭素環式または複素環式芳香族基(置換基は、ハロゲノ基、ニトロ基、シアノ基、アルキル基、アルコキシ基、およびハロゲン置換アルキル基から選ばれる)を意味し、これにはフェニル基、1-または2-ナフチル基、2-、3-または4-ビリジル基、2-または3-フリル基、2-4-または5-チアゾリル基などが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0014】本明細書において「アリールオキシ」とは、 $-OR_1$ (R_1 はアリール基)を意味し、これにはフェノキシ基、1-ナフトキシ基、2-ナフトキシ基などなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。

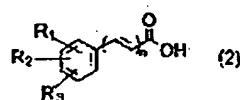
【0015】本明細書において「ハロゲン」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子に由来する基を意味する。

【0016】本明細書において「ハロゲン置換アルキル」とは、1またはそれ以上のハロゲンで置換された上記アルキル基を意味し、これにはクロロメチル基、トリフルオロメチル基、2,2-ジフルオロエチル基などが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0017】本発明の化合物は、いずれも文献未載の新規化合物であり、一般式(1)で表される化合物は、例えば下記一般式(2)で表されるカルボン酸誘導体に、カルボン酸活性化剤を反応させてカルボキシル基における反応性誘導体に導き、ついで、下記一般式(3)で表されるアミド誘導体と反応させることによって製造することができる。

【0018】

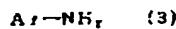
【化3】



【0019】(式2中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、nは前記一般式(1)と同じ意味を持つ。)

【0020】

【化4】



【0021】(式3中、 Ar は前記一般式(1)と同じ意味を持つ。)

【0022】カルボン酸誘導体(2)とカルボン酸活性化剤との反応において、カルボン酸活性化剤としては、例えば塩化チオニル、五塩化リン、クロロギ酸エチル(クロロギ酸メチル、クロロギ酸エチル)、塩化オキサ

10

4

リル、カルボジイミド類(例えば、 N,N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(WS-C))などがあげられるが、カルボジイミド類とN-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4-ジメチルアミノピリジンまたはヒドロキシコハク酸イミドを併用してもよい。この反応は通常、例えば塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、イソプロピルエーテルなどのエーテル類、 N,N -ジメチルホルムアミド、 N,N -ジメチルアセトアミドまたはこれらの混合溶媒などの存在下に行われる。反応温度は通常-10°C~50°Cである。

【0023】この反応において、カルボン酸活性化剤として、塩化チオニル、塩化オキサリルまたは五塩化リンを用いた場合は反応性誘導体として酸ハロゲン化物が得られ、カルボン酸活性化剤としてクロロギ酸エチルを用いた場合には反応性誘導体とした混合酸無水物が得られ、またカルボン酸活性化剤としてカルボジイミド類を用いた場合には反応性誘導体として活性エステルが得られる。

【0024】カルボン酸誘導体(2)のカルボキシル基における反応性誘導体とアミン誘導体(3)との反応は、該反応誘導体が酸ハロゲン化物である場合は例えば塩化メチレン、テトラヒドロフラン、アセトンなどの溶媒中、脱酸剤(ビリジン、トリエチルアミン、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウムなど)の存在下に無水または含水条件下に行なわれる。反応温度は-50°C~100°C、好ましくは-10°C~30°Cである。該反応性誘導体が活性エステルまたは混合酸無水物である場合はカルボン酸誘導体(3)のカルボン酸活性化剤との反応で用いた溶媒と同様な溶媒中で行なうことができる。この場合の反応温度は通常0~30°Cで反応時間は通常1~5時間である。このように製造されるアミド誘導体(1)は、自体公知の分離・精製手段(例えば、クロマトグラフィー、再結晶)などにより単離採取することができる。

【0025】本発明のアミド誘導体は場合によっては薬学的に許容しうるその塩であっても良く、例えばナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩やマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、例えばトリエチルアミン塩、ビリジン塩、トロメタミン塩、ジシクロヘキシルアミン酸塩、キ酸塩、トルエンスルホン酸塩、トリフルオロ酢酸塩、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩等や、アルギニン、リジン、アスパラギン酸などのアミノ酸塩等が挙げられる。

【0026】本発明のアミド誘導体は、血管壁肥厚防止薬として経口的にも非経口的(例えば、静脉内、筋肉内、皮下)にも投与することができる。本発明の有効成分

50

化合物の投与量は、患者の年齢、体重、症状によって異なるが、通常、1日当たり約0.1～1000mg/kg。好ましくは1～10.0mg/kgを1～3回に分けて投与する。

【0027】本発明の化合物は有効成分もしくは有効成分の1つとして単独または製剤担体と共に公知の製剤技術によって錠剤、散剤、カプセル剤、顆粒剤、シロップ剤、水剤、懸濁剤、注射剤、点眼剤、もしくは座剤等の投与に適した任意の製剤形態をとることができる。具体的な製剤担体としては、デンブン類、ショ糖、乳糖、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、結晶セルロース、アルギン酸ナトリウム、リン酸水素カルシウム、メタケイ酸アルミニウムマグネシウム、無水ケイ酸、および台成ケイ酸アルミニウム等の賦形剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチンおよびポリビニルビロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロースカルシウム、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび架橋ポリビニルビロリドン等の崩解剤、ステアリン酸マグネシウムおよびタルク等の滑潤剤、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネット、メタアクリル酸およびメタアクリル酸メチルコーポリマー等の被覆剤、ポリエチレングリコール等の溶解助剤、ラウリル硫酸ナトリウム、レシチン、ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ショ糖脂肪酸エスチル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油およびグリセリルモノステアレート等の乳化剤、EDTAなどのキレート剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、カカオ脂およびウイテブゾールW35等の基剤をあげることが出来る。

【0028】

【実施例】次に実施例、試験例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例、試験例に限定されるべきものではない。

【0029】(実施例1)

2-(2,5-ジメトキシシンナモイルアミノ)チアゾールの合成

2-アミノチアゾール(1.20g, 1.2mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(20ml)溶液に、2,5-ジメトキシケイ皮酸(2.08g, 10mmol)を加える。さらに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(1.91g, 10mmol)とジメチルアミノビリジン(1.22g, 10mmol)を加え、室温で24時間攪拌した。反応液に水を加え酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層は水および酸和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、1%メタノール-クロロホルムの溶出画分より下記式(4)にその構造を示し、下記の性質を示す淡黄色固体(再結晶: THF)の目的化合物(1.

34g, 46%)を得た。

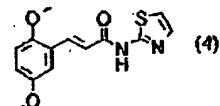
【0030】Mp: 220.0-221.0°C

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 3.79(3H, s), 3.85(3H, s), 7.00(1H, d, J=15.9Hz), 7.01(1H, d, J=2.75), 7.02(1H, s), 7.11(1H, d, J=2.75Hz), 7.20(1H, d, J=3.66Hz), 7.49(1H, d, J=3.66Hz), 7.88(1H, d, J=15.9Hz)

MS(FAB): 292(M+1)

【0031】

【化5】



【0032】(実施例2)

4'-シアノ-4-フェニルベンズアニリドの合成

4'-ビフェニルカルボクライド(1.08g, 5mmol)の塩化メチレン(30ml)溶液に、ジメチルアミノビリジン(733mg, 6mmol)と4-シアノアニリン(591mg, 5mmol)を加え、室温で12時間攪拌した。反応液を塩化メチレンで希釈し、1規定塩酸水溶液、酸和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、1%メタノール-クロロホルムの溶出画分より下記式(5)にその構造を示し、下記の性質を示す無色固体(再結晶: 酢酸エチル-ヘキサン)の目的化合物(990mg, 66%)を得た。

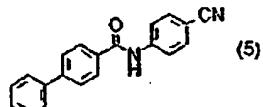
【0033】Mp: 215.0-216.0°C

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.41(1H, t, J=7.8Hz), 7.45(2H, t, J=7.8Hz), 7.62(2H, d, J=7.8Hz), 7.64(2H, d, J=8.40Hz), 7.72(2H, d, J=8.10Hz), 7.81(2H, d, J=8.40Hz), 7.93(2H, d, J=8.10Hz), 8.03(1H, b,s)

MS(FAB): 299(M+1)

【0034】

【化6】



【0035】(実施例3)

2',5'-ジメトキシ-4-フェニルベンズアニリドの合成

実施例1の方針に準じて、下記式(6)にその構造を示す

(5)

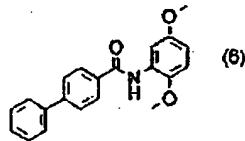
特開平9-3019

し、下記の性質を示す目的化合物を製造した。

[0036] Mp : 139.0-140.0°C
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.82 (3H, s), 3.90 (3H, s), 6.61 (1H, d, J = 8.80Hz), 6.84 (1H, d, J = 8.80Hz), 7.40 (1H, t, J = 7.30Hz), 7.47 (2H, J = 7.30Hz), 7.63 (2H, d, J = 8.60Hz), 7.72 (2H, d, J = 8.60Hz), 7.97 (2H, d, J = 8.60Hz), 8.31 (1H, s), 8.62 (1H, bs)
MS (FAB) : 334 (M+1)

[0037]

[化7]



[0038] (実施例4)

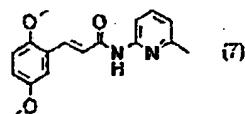
2-(2,5-ジメトキシシンナモイルアミノ)-6- メチルピリジンの合成

実施例2の方法に準じて、下記式(7)にその構造を示し、下記の性質を示す目的化合物を製造した。

[0039] ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.46 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.82 (3H, s), 6.68 (1H, d, J = 15.6Hz), 6.83-6.91 (3H, m), 7.00 (1H, s), 7.62 (1H, dd, J = 8.4, 7.6Hz), 7.95 (1H, d, J = 15.6Hz), 8.17 (1H, d, J = 8.4Hz), 8.53 (1H, bs)
MS (FAB) : 299 (M+1)

[0040]

[化8]



[0041] (実施例5)

2-(2,4-ジメトキシシンナモイルアミノ)-6- メチルピリジンの合成

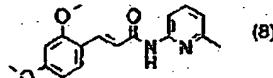
実施例2の方法に準じて、下記式(8)にその構造を示し、下記の性質を示す目的化合物を製造した。

[0042] Mp : 138-143°C
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.47 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.86 (3H, s), 6.46 (1H, s), 6.51 (1H, d, J = 8.4Hz), 6.61 (1H, d, J = 15.8Hz), 6.89 (1H, d, J = 7.6Hz), 7.41 (1H,

8) H, d, J = 8.4Hz), 7.61 (1H, dd, J = 8.0, 7.6Hz), 7.90 (1H, d, J = 15.8Hz), 8.16 (1H, d, J = 8.0Hz), 8.19 (1H, s)
MS (FAB) : 299 (M+1)

[0043]

[化9]



[0044] (実施例6)

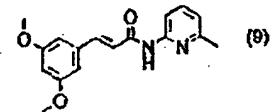
2-(3,5-ジメトキシシンナモイルアミノ)-6- メチルピリジンの合成

実施例1の方法に準じて、下記式(9)にその構造を示し、下記の性質を示す目的化合物を製造した。

[0045] Mp : 136-138°C
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.46 (3H, s), 3.79 (3H, s), 6.48 (1H, d, J = 15.4Hz), 6.48 (1H, s), 6.63 (1H, s), 6.92 (1H, d, J = 7.6Hz), 7.63 (1H, dd, J = 8.0, 7.6Hz), 7.67 (1H, d, J = 15.4Hz), 8.16 (1H, d, J = 8.0Hz), 8.69 (1H, s)
MS (FAB) : 299 (M+1)

[0046]

[化10]



[0047] (実施例7)

2-(4-ビフェニルカルボニルアミノ)ピリジンの合 成

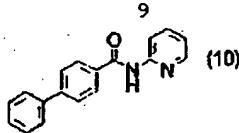
実施例1の方法に準じて、下記式(10)にその構造を示し、下記の性質を示す目的化合物を製造した。

[0048] Mp : 164-165°C
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.02-7.06 (1H, m), 7.37-7.41 (1H, m), 7.44-7.49 (2H, m), 7.61-7.63 (2H, m), 7.70 (2H, d, J = 8.8Hz), 7.73-7.77 (1H, m), 8.00 (2H, d, J = 8.80Hz), 8.21-8.23 (1H, m), 8.42 (1H, d, J = 8.40Hz), 9.02 (1H, s)
MS (FAB) : 275 (M+1)

[0049]

[化11]

56



【0050】(実施例8)

2-(4-ビフェニルカルボニルアミノ)-4,6-ジメチルピリジンの合成

実施例1の方法に準じて、下記式(11)にその構造を示し、下記の性質を示す目的化合物を製造した。

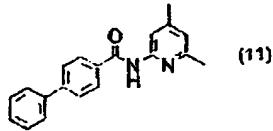
【0051】 $M_p: 156 - 159^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.38 (3H, s), 2.43 (3H, s), 6.78 (1H, s), 7.40 (1H, m), 7.47 (2H, m), 7.63 (2H, m), 7.71 (2H, d, $J = 8.6\text{Hz}$), 8.00 (2H, d, $J = 8.6\text{Hz}$), 8.07 (1H, s), 8.60 (1H, s)

MS (FAB): 303 ($M+1$)

【0052】

【化12】



【0053】(実施例9)

2-(5-(3,4,5-(トリメトキシ)フェニル)-ペンタ-2,4-ジエノイル)アミノ-6-メチルピリジンの合成

実施例1の方法に準じて、下記式(12)にその構造を示し、下記の性質を示す目的化合物を製造した。

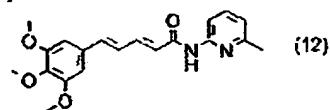
【0054】 $M_p: 169 - 171^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.46 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.90 (3H, s), 6.07 - 8.15 (9H, m), 8.27 (1H, bs)

MS (FAB): 377 ($M+1$)

【0055】

【化13】



【0056】(試験例)

培養平滑筋細胞の増殖抑制作用

6週齢Wistar系雄性ラット(日本チャールズリバーフ

10

製)の腹部大動脈から中膜平滑筋層を取り出し、1mm²の切片にした後、2.5cm²の培養プラスコ(コーニング社製)にはりつけ、10%血清を含む Dulbecco modified eagle medium(以下DMEMと略す: 日本社製)にて、2~3週間37°C、95%O₂+5%CO₂の条件下にてインキュベーターで培養した。切片から伸長し、分裂した細胞を初代培養平滑筋細胞として採取した。初代培養平滑筋細胞は、直徑9cmのシャーレ(コーニング社製)にて10%牛胎児血清(ギブコ社製)を含むDME M中で培養し、コンフルエンスに達する3~4日目に3倍量に維代した。この操作を4~8回繰り返す間の、すなわち、維代数5~9代の間の細胞を用いて試験を行った。上記培養平滑筋細胞は24穴プレート(ファルコン社製)に8×10⁴個の平滑筋細胞/穴/700μl DMEMの割合で播種した。オーバーナイト後、無血清にして、2日間インキュベーターで培養した。この条件下では、培養平滑筋細胞は細胞周期がG₀期(休止期)になり、分裂しなくなる。

【0057】試験に供したヒドロキサム誘導体は dimethylsulfoxide(DMSO)に溶解後、4% bovine serum albuminを含むDMEMによります100倍に希釈し、さらにDMEMで20倍に希釈した。つまり2000倍希釈試験溶液を増殖刺激因子とともに上記条件下の細胞に添加した。使用した増殖因子は、10%牛胎児血清、10ng/ml血小板増殖因子(PDGF)、5ng/ml線維芽細胞増殖因子(FGF)、5ng/ml上皮細胞増殖因子(EGF)、20ng/mlインスリン様増殖因子-1(IGF-1)をそれぞれ使用した。刺激18時間後に0.5μCi/ml/穴の割合で [³H]-methyl thymidine(アマチャム社製)を添加し、6時間後に培地を除去した。細胞は1mlのリン酸緩衝液(Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free)で2回洗浄後、500μlの0.1%SDSを含むトルス塩酸緩衝液で溶出した。十分に搅拌後500μlのうち100μlをろ紙に染み込ませ風乾させた。ろ紙は4°C下、5%トリクロロ酢酸(含10%毗ロリン酸ナトリウム)溶液で15分ずつ3回、エタノールで15分ずつ2回洗浄後風乾し、トルエン系シンチレーター10mlを含むバイアル瓶底に沈めた。これを液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)にて5分間測定した。表1には10%牛胎児血清と10ng/ml血小板増殖因子(PDGF)刺激による薬物の50%平滑筋細胞増殖阻害活性濃度(IC_{50})を示す。

【0058】

【表1】

11

12

表1 培養平滑筋細胞増殖抑制作用に対する
本発明のアミド誘導体の抑制効果

実験番号	構造式	血清抑制50%抑制濃度 (mM/L)	P D G P 刺激50%抑制濃度 (mM/L)
1	4	7.2×10^{-6}	1.9×10^{-6}
2	5	>100	5.8×10^{-7}
3	6	4.1×10^{-5}	1.5×10^{-6}
4	7	1.1×10^{-5}	1.3×10^{-6}
5	8	1.5×10^{-5}	2.2×10^{-6}
6	9	6.5×10^{-6}	1.3×10^{-6}
7	10	>100	2.0×10^{-6}
8	11	2.8×10^{-5}	3.1×10^{-6}
9	12	4.2×10^{-5}	6.2×10^{-7}

【0059】(急性毒性) ICR系雄性マウス(5週齢)を用いて経口および静脈内投与により急性毒性試験を行った結果、本発明のアミド誘導体のLD₅₀値はいずれも320mg/kg以上であり、有効性に比べて高い安全性が確認された。

【0060】

* 【発明の効果】本発明に係る新規なアミド誘導体およびこれを含有する医薬剤は、平滑筋細胞に代表される腎メサンジクム細胞、線維芽細胞等の軟骨の中胚葉系細胞の増殖抑制作用を有し、PTCA後の再狭窄、慢性糸球体腎炎等に代表される炎症性並びに細胞増殖性線維硬化症を有効に治療しうる医薬品として有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ^o	識別記号	戸内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 C 231/02		9547-4H	C 07 C 231/02	
233/02		9547-4H	233/02	
233/64		9547-4H	233/64	
233/88		9547-4H	233/88	
255/60		9357-4H	255/60	
C 07 D 213/75			C 07 D 213/75	
277/46			277/46	